

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DE 00 / 00079



REC'D 03 MAR 2000
WIPO PCT

Bescheinigung

ESU

Die Anmelderin Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts in Heidelberg, Neckar/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Selektion von monoklonalen Antikörpern"

am 11. Januar 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 07 K und C 12 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 16. Februar 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 199 00 635.0

Wagsschneider

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Unser Zeichen: 2527 - hu / msl

Selektion von monoklonalen Antikörpern

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Selektion von monoklonalen Antikörpern sowie hierfür verwendbare Mittel.

Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern beruht auf einem von Köhler und Milstein entwickelten Verfahren. Nach diesem Verfahren werden B-Lymphozyten mit Myelomzellen fusioniert, wodurch Antikörper-produzierende Hybridomzellen erhalten werden. Ein solches Verfahren weist große Nachteile auf. Insbesondere ist es aufwendig Antikörper zu selektionieren, da dies eine getrennte Kultivierung von Hybridomzellen erfordert. Letzteres führt auch dazu, daß nur eine begrenzte Zahl von Hybridomzellen erfaßt und somit auch nicht alle Antikörper selektioniert werden können, was insbesondere nachteilig ist, wenn Antikörper mit höchster Affinität für ein Antigen selektioniert werden sollen.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem monoklonale Antikörper hergestellt werden können, wobei vorstehende Nachteile vermieden werden.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß monoklonale Antikörper auf der Zelloberfläche von Hybridomzellen mittels eines Antikörper-Bindeproteins präsentiert werden können. Er hat erkannt, daß hiermit monoklonale Antikörper selektioniert werden können, ohne daß Hybridomzellen getrennt kultiviert werden müssen. Auch hat er erkannt, daß die Selektion von monoklonalen Antikörpern sowohl gegenüber einem bestimmten als auch vielen (un)bestimmten Antigenen einer Antigen-Bibliothek erfolgen kann. Ferner hat er erkannt, daß die Selektion von monoklonalen Antikörpern auch hinsichtlich ihrer Affinitätsstärke zu bestimmten Antigenen erfolgen kann.

Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders genutzt, ein Verfahren zur Selektion von monoklonalen Antikörpern bereitzustellen. Ein solches Verfahren umfaßt die Fusionierung von B-Lymphozyten mit Myelomzellen zu Antikörper-produzierenden Hybridomzellen, wobei die Antikörper auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen mittels eines Antikörper-Bindeproteins präsentiert werden, und die Bindung der Antikörper an Antigene.

Der Ausdruck "B-Lymphozyten" umfaßt B-Lymphozyten jeglicher Art und Abstammung. Auch können es Vorstufen von B-Lymphozyten sein. Ferner können die B-Lymphozyten von Tieren, wie Mäusen, Ratten, Kaninchen, etc., oder dem Menschen stammen. Desweiteren können die B-Lymphozyten von einem gesunden oder kranken Organismus stammen. Günstig ist es, wenn sie von einem immunisiertem Organismus stammen. Besonders günstig ist es, wenn die B-Lymphozyten für humane Antikörper oder Teile davon kodieren. Handelt es sich um B-Lymphozyten aus Tieren, ist dies erreichbar, indem die Tiere für die humanen Antikörper bzw. Teile davon transgen sind. Die Herstellung solcher Tiere kann durch übliche Verfahren erfolgen, wobei sich anbietet, die Gene für die humanen Antikörper die Teile davon in embryonale Stammzellen einzuführen, aus denen dann die Tiere generiert werden. Die Bereitstellung von B-Lymphozyten und ihren Vorstufen kann durch übliche Verfahren erfolgen.

Der Ausdruck "Myelomzellen" umfaßt Myelomzellen jeglicher Art und Abstammung. Auch können es Vorläufer von Myelomzellen sein. Ferner können die Myelomzellen von Tieren, wie Mäusen, Ratten, Kaninchen, etc., oder dem Menschen stammen. Bevorzugte Myelomzellen sind Abkömmlinge der Maus-Stämme P3K, P3-X63.Ag8, X63.Ag8.653, NSO/1, Sp2/O-Ag14 und FO, der Ratten-Stämme Y3-Ag1.2.3, YB2/O und IR9834, und der menschlichen Stämme U266, SK007 und Karpas 707. Die Bereitstellung von Myelomzellen und ihren Vorstufen kann durch übliche Verfahren erfolgen.

Der Ausdruck "Antikörper-produzierende Hybridomzellen" umfaßt Zellen, die durch Fusion von B-Lymphozyten und Myelomzellen entstehen und Antikörper

produzieren. Es wird auf die Ausführungen hinsichtlich B-Lymphozyten und Myelomzellen entsprechend verwiesen. Hybridomzellen können tierische und/oder menschliche Nukleinsäuren bzw. Proteine aufweisen. Die Kultivierung von Hybridomzellen kann durch übliche Verfahren erfolgen. Ferner kann es günstig sein, wenn die Hybridomzellen Rekombinasen, z.B. Rag1 oder Rag2, und/oder Mutasen (über)exprimieren. Solches kann durch Transfektion der Hybridomzellen mit entsprechenden Expressionsvektoren erreicht werden. Der Fachmann kennt solche Expressionsvektoren.

Der Ausdruck "Fusion von B-Lymphozyten mit Myelomzellen" betrifft jegliches Verfahren, mit dem diese Zellen fusioniert werden können. Günstig ist ein Verfahren, bei dem die Zellen über Polyethylenglykol fusioniert werden. Es wird auf die Beispiele verwiesen.

Der Ausdruck "Bindung der Antikörper an Antigene" betrifft jegliches Verfahren, mit dem die auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen exprimierten Antikörper an Antigene binden können. Die Antigene können an Trägern, z.B. Magneto-beads, gebunden sein. Ferner können sie markiert, z.B. fluoreszenzmarkiert, sein. Als Fluoreszenzmarker bieten sich z.B. FITC, TRITC, Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy7 und Phycoerythrin an. Desweiteren können die Antigene an Biotin gekoppelt sein. Gebundene Antigene können dann durch übliche Verfahren, z.B. FACS-Analyse, nachgewiesen werden, wodurch auch die entsprechenden Antikörper detektiert werden. Es wird auf die Beispiele verwiesen.

Der Ausdruck "Antikörper-Bindeprotein" umfaßt jegliches Protein, das einen Antikörper binden und an der Zelloberfläche von Hybridomzellen präsentieren kann. Insbesondere kann das Protein ein Signalpeptid, eine von der Spezifität des Antikörpers unabhängige Antikörper-Bindestelle und einen Membrananker aufweisen. Beispiele für ein solches Protein sind natürliche Fc-Bindeproteine, wie CD16, CD32 und CD64. Ferner kann das Protein eine Kombination aus einem Signalpeptid, einer Antikörper-Bindestelle und einem Membrananker aufweisen, die in der Natur nicht vorkommt. Eine solche Kombination kann Teile natürlicher

Fc-Bindeproteine umfassen. Ferner kann sie als Signalpeptid ein solches einer Maus-Ig-Kappa-Kette oder eines Maus-MHC-Klasse I k(k)-Moleküls, als Membrananker eine Transmembran-Domäne von PDGFR oder CD52 und als Antikörper-Bindestelle eine Antigen-Bindungsdomäne eines bakteriellen Proteins, wie Protein A, Protein G, Protein L oder Protein LG, aufweisen. Günstig kann es sein, wenn die Kombination mehrere Signalpeptide, Antikörper-Bindestellen und/oder Membrananker aufweist. Besonders günstig kann es sein, wenn das Antikörper-Bindeprotein, insbesondere die Antikörper-Bindungsdomäne der bakteriellen Proteine Codons aufweist, die für die Expression in Säugetierzellen optimiert sind. Der Fachmann weiß, um welche Codons es sich hier handelt.

Bevorzugte Antikörper-Bindeproteine sind in den Figuren 1-3 angegeben. Das Antikörper-Bindeprotein von Fig. 1 umfaßt das Signalpeptid eines Maus-MHC-Klasse I k(k)-Moleküls, vier Antikörper-Bindungsdomänen des Proteins L und die Transmembran-Domäne von CD52. Die DNA- und Aminosäuresequenzen des Antikörper-Bindeproteins sind zwischen den Nukleotid-Nummern 682-1782 angegeben. Das Antikörper-Bindeprotein von Fig. 2 umfaßt das Signalpeptid einer Maus-Ig-Kappa-Kette, zwei Antikörper-Bindestellen des Proteins G und die Transmembran-Domäne von CD52. Die DNA- und Aminosäuresequenzen des Antikörper-Bindeproteins sind zwischen den Nukleotid-Nummern 647-1420 angegeben. Das Antikörper-Bindeprotein von Fig. 3 umfaßt das Signalpeptid des Maus-MHC-Klasse I k(k)-Moleküls, zwei Antikörper-Bindestellen des Proteins G und die Transmembran-Domäne von PDGFR. Die DNA- und Aminosäuresequenzen des Antikörper-Bindeproteins sind zwischen den Nukleotid-Nummern 682-1431 angegeben. Die Antikörper-Bindestellen aller drei Antikörper-Bindeproteine weisen auf DNA-Ebene Codons auf, die für die Expression in Säugetierzellen optimiert sind.

Ein Antikörper-Bindeprotein der Figuren 1, 2 bzw. 3 kann eine Aminosäuresequenz aufweisen, die sich durch ein oder mehrere Aminosäuren von der Aminosäuresequenz in den Figuren 1, 2 bzw. 3 unterscheidet. Die Unterschiede können in Additionen, Deletionen, Substitutionen und/oder Inversionen von

einzelnen Aminosäuren liegen. Allerdings hybridisiert die DNA dieses Antikörper-Bindeproteins mit der in den Figuren 1, 2 bzw. 3 angegebenen DNA. Der Ausdruck "Hybridisierung" weist auf eine Hybridisierung unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20°C unter dem Schmelzpunkt der DNA, hin. Ferner weist das Antikörper-Bindeprotein mit der veränderten Aminosäuresequenz Gesamt- bzw. Teilfunktionen auf, die mit jenen des Antikörper-Bindeproteins der Figuren 1, 2 bzw. 3 vergleichbar sind.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, die für ein vorstehendes Antikörper-Bindeprotein kodiert. Die Nukleinsäure kann eine RNA oder eine DNA sein. Bevorzugt ist eine DNA, die folgendes umfaßt:

- (a) Die DNA eines Antikörper-Bindeproteins der Figuren 1, 2 bzw. 3, eine sich hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterscheidende DNA, oder
- (b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

Der Ausdruck "eine sich durch ein oder mehrere Basenpaare unterscheidende DNA" umfaßt jegliche für ein Antikörper-Bindeprotein der Figuren 1, 2 bzw. 3 kodierende DNA, die mit der DNA der Fig. 1, 2 bzw. 3 hybridisiert. Die Unterschiede können in Additionen, Deletionen, Substitutionen und/oder Inversionen von einzelnen Basenpaaren liegen. Hinsichtlich des Ausdrucks "Hybridisierung" wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

Eine erfindungsgemäße DNA kann als solche oder in Kombination mit jeglicher anderen DNA vorliegen. Insbesondere kann eine erfindungsgemäße, für ein Antikörper-Bindeprotein kodierende DNA in einem Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für E. coli sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, pCDM8 und pCEV4

anzugeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A.

Der Fachmann weiß, in welcher Weise die erfindungsgemäße DNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese DNA in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid kodierenden DNA inseriert werden kann, so daß die erfindungsgemäße DNA in Form eines Fusionsproteins exprimiert werden kann.

Bevorzugte Expressionsvektoren, die eine erfindungsgemäße DNA enthalten, sind in den Figuren 1-3 angegeben. Es handelt sich um die Expressionsvektoren pSEX11L4, pSEX11G2⁺ und pSEX15G2. Diese wurden bei der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) am 14. Dezember 1998 hinterlegt. Im einzelnen wurde pSEX11L4 unter DSM 12580, pSEX11G2⁺ unter DSM 12581 und pSEX15G2 unter DSM 12582 hinterlegt.

Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um die erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende DNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die E.coli-Stämme XL-1 Blue, Top 10 F, HB101, DH5alpha, x1776, JM101, JM 109, BL21 und SG 13009, die Hefe-Stämme *Saccharomyces cerevisiae* und *Pichia pastoris*, die tierischen Zellen L, NIH 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero, HeLa, Myelom- und Hybridomzellen sowie die Insektenzellen sf9.

Desweiteren kennt der Fachmann Bedingungen, transformierte bzw. transfigurierte Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße DNA exprimierte Protein bzw. Fusionsprotein zu isolieren und zu reinigen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehendes Protein bzw. Fusionsprotein gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polyklonal bzw. monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere

Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklonalen Antikörper, mit einem vorstehenden (Fusions)protein oder Fragmenten davon zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können mit dem gleichen (Fusions)protein oder Fragmenten davon erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann dann aus dem Serum bzw. Ei der Tiere erhalten werden. Für den monoklonalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit. Ein solcher umfaßt eine oder mehrere der folgenden Komponenten:

- (a) eine erfindungsgemäße DNA,
- (b) eine eine erfindungsgemäße DNA exprimierende Zelle,
- (c) ein erfindungsgemäßes Antikörper-Bindeprotein,
- (d) einen erfindungsgemäßen Antikörper, sowie
- (e) übliche Hilfsstoffe, wie Träger, Puffer, Lösungsmittel, Kontrollen, Marker, Nachweisreagentien für die Komponenten (a) - (d)

Von den einzelnen Komponenten können jeweils ein oder mehrere Vertreter vorliegen. Hinsichtlich der einzelnen Ausdrücke wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen. Diese gelten hier entsprechend.

Die vorliegende Erfindung zeichnet sich dadurch aus, daß von Hybridomzellen produzierte Antikörper auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen präsentiert werden. Dies erfolgt über ein Antikörper-Bindeprotein. Ein solches kann über die zur Herstellung der Hybridomzellen verwendeten Myelomzellen in die Hybridomzellen eingeführt werden. Ferner kann das Antikörper-Bindeprotein über einen es kodierenden Expressionsvektor in die Hybridomzellen eingeführt werden.

Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, Antikörper zu selektionieren. Dies kann ohne großen Aufwand erfolgen, da Hybridomzellen nicht getrennt kultiviert werden müssen. Vielmehr können komplexe Gemische von Hybridomzellen unmittelbar zur Selektion von Antikörpern verwendet werden. Ferner können

Antikörper hinsichtlich ihrer Affinitätsstärke zu bestimmten Antigenen selektio-
niert werden. Desweiteren eignet sich die vorliegende Erfindung Antikörper von
Hybridomzell-Bibliotheken nicht nur gegenüber einem bestimmten Antigen,
sondern auch gegenüber vielen (un)bestimmten Antigenen von Antigen-Biblio-
theken zu selektionieren.

Somit liefert die vorliegende Erfindung ein Mittel, mit dem u.a. die großen Zeit-
und Kosten-Probleme vermieden werden können, die bei der Selektion von
monoklonalen Antikörpern bisher auftraten.



Kurze Beschreibung der Zeichnungen

- Fig. 1 zeigt den erfindungsgemäßen Expressionsvektor pSEX11L4 (Fig. 1(A)), der für ein Antikörper-Bindeprotein kodiert (Fig. 1(B)). Es wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.
- Fig. 2 zeigt den erfindungsgemäßen Expressionsvektor pSEX11G2* (Fig. 2(A)), der für ein Antikörper-Bindeprotein kodiert (Fig. 2(B)). Es wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.
- Fig. 3 zeigt den erfindungsgemäßen Expressionsvektor pSEX15G2 (Fig. 3(A)), der für ein Antikörper-Bindeprotein kodiert (Fig. 3(B)). Es wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1: Herstellung von Myelomzellen, die ein Antikörper-Bindeprotein auf ihrer Zelloberfläche exprimieren.

(A) Transiente Expression

Es werden Zellen der Myelomzelllinie X63-Ag8.653 verwendet. Diese Zellen (10^7) werden mit 20-40 μg des erfindungsgemäßen Expressionsvektors pSEX11G2' (vgl. Fig. 2) transfiziert. Als Transfektionstechnik wird eine Elektroporation durchgeführt, die zwei Pulse zu 2 ms bei 500 V umfaßt. Die Zellen werden 48 h in RPMI-Medium, das 10 % FCS enthält, bei 37°C und 5-7,5 % CO_2 inkubiert. Danach werden die Zellen mit kaltem DPBS + 0.1 % Na-Azid gewaschen, bevor sie 45 min bei 0°C mit DPBS + 0.1 % Na-Azid plus 25 $\mu\text{g/ml}$ Ziege anti-Kalb Antikörper (FITC markiert; GAB-FITC, Dianova) inkubiert werden. Nach Waschen mit DPBS + 0.1 % Na-Azid werden die Zellen in DPBS + 0.1 % Na-Azid + 1 $\mu\text{g/ml}$ Propidium-Jodid inkubiert und nach Anregung mit Blaulicht einer FACS-Analyse unterzogen.

Es zeigt sich, daß die transfizierten Myelomzellen eine grüne Fluoreszenz aufweisen, die durch die transiente Expression eines Antikörper-Bindeproteins auf der Zelloberfläche der Myelomzellen bedingt ist.

(B) Stabile Expression

Die unter (A) erhaltenen Myelomzellen werden einer 14-24 tägigen G418-Selektion unterzogen, bevor sie, wie unter (A) beschrieben, mit GAB-FITC inkubiert und einer FACS-Analyse unterzogen werden. Myelomzellen, die eine starke grüne Fluoreszenz aufweisen, werden weiteren G418-Selektionsrunden unterzogen.

Es wird die Myelomzelllinie X63-Ag8.653.3 erhalten, die stabil ein Antikörper-Bindeprotein auf ihrer Zelloberfläche exprimiert.

Beispiel 2: Herstellung von Hybridomzellen, die auf ihrer Zelloberfläche Antikörper mittels eines Antikörper-Bindeproteins exprimieren.

(A)

Es werden 10 Balb/c-Mäuse subkutan mit je 100 µg abgetöteten *Helicobacter pylori* Bakterien in komplettem Freund'schen Adjuvans, das abgetötete *Mycobacter tuberculosis* Bakterien enthält, immunisiert. Nach 4 bzw. 7 Wochen erfolgt jeweils eine intraperitoneale Booster-Injektion mit 100 µg abgetöteter *Helicobacter pylori* / *Mycobacter tuberculosis* Bakterien. Den Mäusen werden vor jeder Immunisierung bzw. nach der letzten Immunisierung jeweils 100 µl Blutserum entnommen und im Westernblot wird die Antigenspezifische Immunantwort der Maus überprüft. Als Antigen wird ein Aufschluß von bakteriellem Gesamtprotein von *Helicobacter pylori* bzw. *Mycobacter tuberculosis* verwendet. Der Nachweis gebundener Maus-Antikörper wird durch einen Peroxidase-konjugierten Ziege anti-Maus-Antikörper (Dianova) geführt. Mäusen mit einer deutlichen Antigen-spezifischen Immunantwort wird die Milz entnommen und die Lymphozyten werden mit Zellen der Myelomzelle X63-Ag8.653.3 von Beispiel 1 (B) fusioniert. Die Fusion erfolgt durch Polyethylenglykol (vgl. Goding, J.W., Cell Biology, Biochemistry and Immunology, 3. Auflage, (1996), Verlag Accademic Press Limited, 24-28). Es werden Hybridomzellen erhalten. Diese werden 10-12 Tage in HAT-Medium bei 37°C inkubiert. Es wird die Hybridomzell-Bibliothek 2A erhalten.

Es werden Hexapeptide mit N-terminalem Biotin synthetisiert. Die Peptide entsprechen den 6C-terminalen Aminosäuren von 101 bzw. 118 Genprodukten von *Helicobacter pylori* bzw. *Mycobacter tuberculosis*. Ferner werden 10³ Zellen der Hybridomzell-Bibliothek 2A mit kaltem DPBS + 0,1 % Na-Azid gewaschen und 45 min bei 0°C mit DPBS + 0,1 % Na-Azid + 10 µg/ml der vorstehenden Biotin-markierten Peptide inkubiert. Die Zellen werden mit kaltem DPBS + 0,1 % Na-Azid gewaschen und 45 min bei 0°C mit 10 µg/ml Streptavidin-FITC inkubiert. Nach Waschen mit DPBS + 0,1 % Na-Azid werden die Zellen in DPBS + 0,1 % Na-Azid + 1 µg/ml Propidium-Jodid inkubiert und nach Anregung mit Blaulicht einer FACS-Analyse unterzogen.

Es zeigt sich, daß die Hybridomzellen eine grüne Fluoreszenz aufweisen. Diese Fluoreszenz ist durch die Expression von Antikörpern auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen bedingt. Weiterführende Untersuchungen zeigen, daß die Antikörper eine anti-*Helicobacter pylori*- bzw. *Mycobacter tuberculosis*-Aktivität aufweisen.

(B)

Es werden Zellen der Hybridomzelllinie U98/6, die einen Maus-anti-Urokinase-Antikörper produzieren, verwendet. Diese Zellen (10^7) werden mit 20-40 µg des erfindungsgemäßen Expressionsvektors pSEX11G2⁺ (vgl. Fig. 2) transfiziert. Als Transfektionstechnik wird eine Elektroporation durchgeführt, die zwei Pulse zu 2 ms bei 400 V umfaßt. Die Zellen werden 48 h in inkomplettem AIM V-Medium bei 37°C und 5-7,5 % CO₂ inkubiert. Danach werden die Zellen mit kaltem DPBS + 0.1 % Na-Azid gewaschen, bevor sie 45 min bei 0°C mit DPBS + 0.1 % Na-Azid + 10 µg/ml Urokinase-Biotin inkubiert werden. Nach Waschen mit DPBS + 0.1 % Na-Azid werden die Zellen in DPBS + 0.1 % Na-Azid + 10 µg/ml Streptavidin-FITC inkubiert und nach Anregung mit Blaulicht einer FACS-Analyse unterzogen.

Es zeigt sich, daß die transfizierten Hybridomzellen eine grüne Fluoreszenz aufweisen. Diese Fluoreszenz ist durch die Expression von Antikörpern auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen bedingt. Weiterführende Untersuchungen zeigen, daß die Antikörper eine anti-Urokinase-Aktivität aufweisen.

Die erhaltenen Hybridomzellen werden einer 14-24 tägigen G418-Selektion unterzogen, bevor sie erneut, wie vorstehend beschrieben mit Urokinase-Biotin und Streptavidin-FICS inkubiert und einer FACS-Analyse unterzogen werden. Hybridomzellen, die eine starke grüne Fluoreszenz aufweisen, werden weiteren G418-Selektionsrunden unterzogen.

Es wird die Hybridomzelllinie U98/6.3.3 erhalten, die stabil Antikörper auf ihrer Zelloberfläche exprimiert.

Beispiel 3: Selektion von monoklonalen Antikörpern, die mittels eines Antikörper-Bindeproteins auf der Zelloberfläche von Hybridomzellen exprimiert werden.

10³ Zellen der Hybridomzelllinie U98/6.3.3 von Beispiel 2 (B) werden mit 10⁷ Zellen der Hybridomzelllinie DOB.L1.3 gemischt. Letztere Hybridomzelllinie produziert einen den C-Terminus der humanen HLA-DO- β -Kette erkennenden Antikörper. Dieser wird mittels des gleichen Antikörper-Bindeproteins wie in der Hybridomzelllinie U98/6.3.3 von Beispiel 2 (B) auf der Zelloberfläche exprimiert. Das Zellgemisch wird mit kaltem DPBS + 0,1 % Na-Azid gewaschen und 45 min bei 0°C mit DPBS + 0,1 % Na-Azid + 10 μ g/ml Urokinase-Biotin inkubiert. Nach Waschen mit DPBS + 0,1 % Na-Azid wird das Zellgemisch in DPBS + 0,1 % Na-Azid + 10 μ g/ml Streptavidin-FITC inkubiert und nach Anregung mit Blaulicht in einen FACS-Sorter gegeben.

Es werden Hybridomzellen mit grüner Fluoreszenz selektioniert. In weiterführenden Untersuchungen zeigen diese eine anti-Urokinase-Aktivität. Es werden die Hybridomzelllinien U98/6.3.3 S1-S50 erhalten.

Beispiel 4: Herstellung und Reinigung eines erfindungsgemäßen Antikörper-Bindeproteins

(A)

Die DNA von Fig. 1 zwischen den Nukleotid-Nummern 682-1782 wird mit BAMHI-Linkern versehen, mit BamHI nachgespalten und in den mit BamHI gespaltenen Expressionsvektors pQE-8 (Qiagen) inseriert. Es wird das Expressionsplasmid pQE-8/Antikörper-Bindeprotein erhalten. Ein solches kodiert für ein Fusionsprotein aus 6 Histidin-Resten (N-Terminuspartner) und dem erfindungsgemäßen Antikörper-Bindeprotein von Fig. 1 (C-Terminuspartner). pQE-8/Antikörper-Bindeprotein wird zur Transformation von E.coli SG 13009(vgl. Gottesman, S. et al., J. Bacteriol. 148, (1981), 265-273) verwendet. Die Bakterien werden in einem LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin und 25 μ g/ml Kanamycin

kultiviert und 4 h mit 60 μ M Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Durch Zugabe von 6 M Guanidinhydrochlorid wird eine Lyse der Bakterien erreicht, anschließend wird mit dem Lysat eine Chromatographie (Ni-NTA-Resin) in Gegenwart von 8 M Harnstoff entsprechend der Angaben des Herstellers (Qia-gen) des Chromatographie-Materials durchgeführt. Das gebundene Fusionsprotein wird in einem Puffer mit pH 3,5 eluiert. Nach seiner Neutralisierung wird das Fusionsprotein einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. Thomas, J.O. und Kornberg, R.D., J.Mol.Biol. 149 (1975), 709-733).

Es zeigt sich, daß ein erfindungsgemäßes Antikörper-Bindeprotein (Fusionsprotein) in hochreiner Form hergestellt werden kann.

(B)

10⁸ Zellen der in Beispiel 1 (B) erhaltenen Myelomzelllinie X63-Ag8.653.3 werden mit PBS gewaschen, in PBS + 1 % Tween 20 aufgenommen und auf Eis inkubiert. Partikuläre Zellbestandteile werden durch Zentrifugation bei 30.000g abgetrennt und der Überstand wird auf eine IgG Sepharose Säule (IgG Sepharose 6 Fast Flow Lab Pack von Pharmacia) gegeben. Ungebundene Bestandteile werden durch Waschen entfernt und das erfindungsgemäße Antikörper-Bindeprotein wird in saurem pH eluiert.

Nach seiner Neutralisierung wird das Antikörper-Bindeprotein einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. vorstehend).

Es zeigte sich, daß ein erfindungsgemäßes Antikörper-Bindeprotein (Fusionsprotein) in hochreiner Form hergestellt werden kann.

Beispiel 5: Herstellung und Nachweis eines erfindungsgemäßen Antikörpers

Ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 4 wird einer 18 % SDS-

Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Nach Anfärbung des Gels mit 4 M Natriumacetat wird eine ca. 41 kD Bande aus dem Gel herausgeschnitten und in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung inkubiert. Gel-Stücke werden sedimentiert, bevor die Proteinkonzentration des Überstandes durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, der eine Coomassie-Blau-Färbung folgt, bestimmt wird. Mit dem Gel-gereinigten Fusionsprotein werden Tiere wie folgt immunisiert:

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Kaninchen

Pro Immunisierung werden 35 µg gereinigtes Fusionsprotein in 0,7 ml PBS und 0,7 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

- | | |
|---------|---|
| Tag 0: | 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans) |
| Tag 14: | 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA) |
| Tag 28: | 3. Immunisierung (icFA) |
| Tag 56: | 4. Immunisierung (icFA) |
| Tag 80: | Ausbluten |

Das Serum des Kaninchens wird im Immunoblot getestet. Hierzu wird ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 4 einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen und auf ein Nitrocellulosefilter übertragen (vgl. Khyse-Andersen, J., J. Biochem. Biophys. Meth. 10, (1984), 203-209). Die Western Blot-Analyse wurde wie in Bock, C.-T. et al., Virus Genes 8, (1994), 215-229, beschrieben, durchgeführt. Hierzu wird das Nitrocellulosefilter eine Stunde bei 37°C mit einem ersten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist das Serum des Kaninchens (1:10000 in PBS). Nach mehreren Waschschritten mit PBS wird das Nitrocellulosefilter mit einem zweiten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter monoklonaler Ziege Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Dianova) (1:5000) in PBS. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgen mehrere Waschschriffe mit PBS und anschließend die alkalische Phosphatase-Nachweisreaktion mit Entwicklerlösung (36µM 5' Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, 400µM Nitroblau-tetrazolium, 100mM Tris-HCl, pH 9.5, 100

mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$) bei Raumtemperatur, bis Banden sichtbar werden.

Es zeigt sich, daß erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper hergestellt werden können.

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Huhn

Pro Immunisierung werden 40 µg gereinigtes Fusionsprotein in 0,8 ml PBS und 0,8 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

- Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
- Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
- Tag 50: 3. Immunisierung (icFA)

Aus Eigelb werden Antikörper extrahiert und im Western Blot getestet. Es werden erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper nachgewiesen.

Immunisierungsprotokoll für monoklonale Antikörper der Maus

Pro Immunisierung werden 12 µg gereinigtes Fusionsprotein in 0,25 ml PBS und 0,25 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt; bei der 4. Immunisierung ist das Fusionsprotein in 0,5 ml (ohne Adjuvans) gelöst.

- Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
- Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
- Tag 56: 3. Immunisierung (icFA)
- Tag 84: 4. Immunisierung (PBS)
- Tag 87: Fusion

Überstände von Hybridomen werden im Western Blot getestet. Erfindungsgemäße, monoklonale Antikörper werden nachgewiesen.

Unser Zeichen: K 2527 - hu / wd

Patentansprüche

- 5 1. Verfahren zur Selektion von monoklonalen Antikörpern, umfassend die Fusion von B-Lymphozyten mit Myelomzellen zu Antikörper-produzierenden Hybridomzellen, wobei die Antikörper auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen mittels eines Antikörper-Bindeproteins präsentiert werden, und die Bindung der Antikörper an Antigene.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Antikörper-Bindeprotein ein Signalpeptid, eine von der Spezifität des Antikörpers unabhängige Antikörper-Bindestelle und einen Membrananker umfaßt.
- 15 3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Antikörper-Bindeprotein ein Fc-Bindeprotein oder Teile davon umfaßt.
4. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Antikörper-Bindeprotein eine Kombination aus Fc-Bindeproteinen oder Teilen davon umfaßt.
- 20 5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, wobei das Fc-Bindeprotein CD16, CD32 oder CD64 ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 - 5, wobei das Antikörper-Bindeprotein eine Antikörper-Bindungsdomäne der Proteine A, G, L oder LG umfaßt.
- 25 7. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Antikörper-Bindeprotein eine Kombination aus dem Signalpeptid einer Maus-Ig-Kappa-Kette oder eines Maus-MHC-Klasse I k(k)-Moleküls, einer Antikörper-Bindestelle der Proteine A, G, L oder LG und der Transmembran-Domäne von PDGFR oder CD52 umfaßt.

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei das Antikörper-Bindeprotein jenes von Fig. 1, Fig. 2 oder Fig. 3 ist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-8, wobei die Hybridomzellen Rag1 und/oder Rag2 (über)exprimieren.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-9, wobei die Antigene von einer Antigen-Bibliothek stammen.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-10, wobei die Antigene an einen Träger gebunden sind.
12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei der Träger Magnetobeads umfaßt.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-10, wobei die Antigene eine Fluoreszenz- oder Biotinmarkierung umfassen.
14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die Fluoreszenzmarkierung FITC, TRITC, Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy7 und Phycoerythrin umfaßt.
15. Antikörper-Bindeprotein, wobei das Antikörper-Bindeprotein eine Kombination aus dem Signalpeptid einer Maus-Ig-Kappa-Kette oder eines Maus-MHC-Klasse I k(k)-Moleküls, einer Antikörper-Bindestelle der Proteine A, G, L oder LG und der Transmembran-Domäne von PDGFR oder CD52 umfaßt.
16. Antikörper-Bindeprotein nach Anspruch 15, wobei das Antikörper-Bindeprotein die Aminosäuresequenz von Fig. 1, Fig. 2 bzw. Fig. 3 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz umfaßt.
17. DNA, kodierend für das Antikörper-Bindeprotein nach Anspruch 16, um-

fassend:

(a) die DNA eines Antikörper-Bindeproteins der Figuren 1, 2 bzw. 3, eine sich hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterscheidende DNA, oder

5

(b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten Code verwandte DNA.

18. Expressionsvektor, kodierend für die DNA nach Anspruch 17.

10

19. Zellen, enthaltend den Expressionsvektor nach Anspruch 18.

20. Antikörper, gerichtet gegen das Antikörper-Bindeprotein nach Anspruch 15 oder 16.

15

Unser Zeichen: K 2527 - hu / msl

Zusammenfassung

Selektion von monoklonalen Antikörpern

5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Selektion von monoklonalen Antikörpern, umfassend die Fusion von B-Lymphozyten mit Myelomzellen zu Antikörper-produzierenden Hybridomzellen, wobei die Antikörper auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen mittels eines Antikörper-Bindeproteins präsentiert werden, und die Bindung der Antikörper an Antigene. Ferner betrifft die Erfindung hierfür verwendbare Mittel.

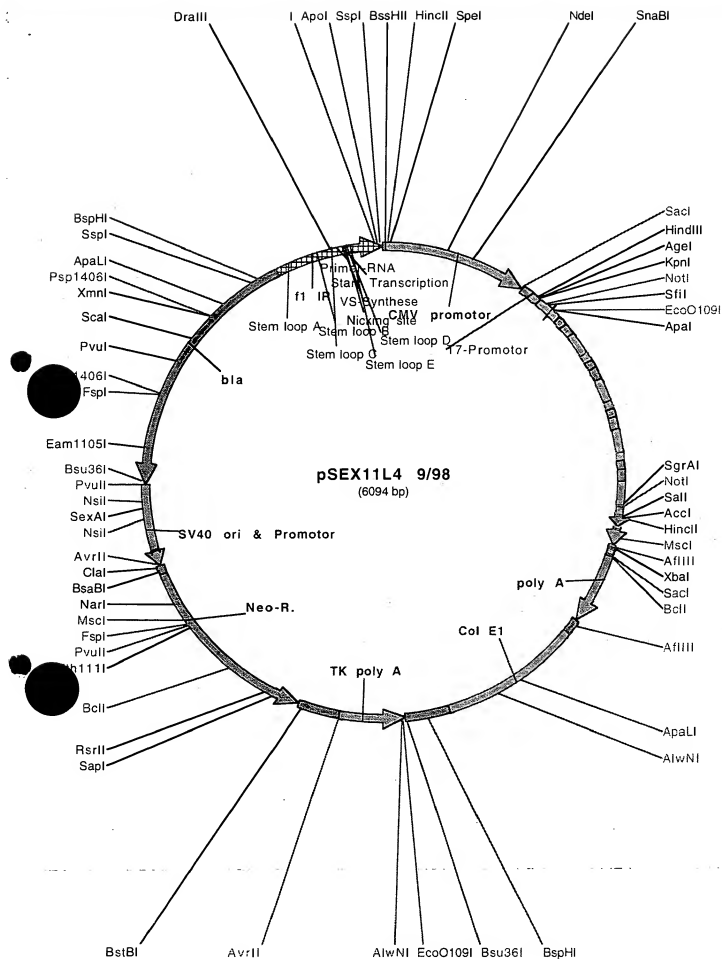


Fig. 1 (A)

BssHII HincII SpeI
 1 CGCGCGCTTGACATTTTATTGACTAGTTTATTAATGATTAATCAATTTGGGTTCATTAGTTTCATAGCCCATATA
 76 TGGAGTTCCCGGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGT
 151 CAATATGACGTATGTTCCCATAGTAAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGT
 NdeI CMV
 226 AAACCTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAAT
 SnaBI
 301 GGCCCGCTGGCATTATGCCCACTACATGACCTTATGGGACTTTCTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCA
 376 TCGCTATTACCATGGTGATCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGCGTGGATAGCGGTTTTGACTACACGGGATTTTC
 451 CAAGTCTCCACCCTATGACGTCATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGATTTTCCAAAATGTGCTA
 SacI
 526 ACAACTCCGCCCCATTGACGCAAAATGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAGCAGAGCTCTCTGGC
 Agel
 1 TAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGAGACCCAAAGCTTGGTACC
 T7-Promotor HindIII KpnI
 SfiI NotI ApaI EcoO109I
 676 GGTGGGATGGCAACCTGCATGCTGCTCTGCTGTGGCGCGCCCTGGCCCGGACTCAGACCCGCGCGGGGGCC
 1 MetAlaProCysMetLeuLeuLeuLeuLeuAlaAlaLeuAlaProThrGlnThrArgAlaGlyAla
 751 CAAAGGGAGAAGACCCCGAGGAGCCCAAGGAGAGGTGACCATCAAGGCCAACCTGATCTACGCGCAGCGCAAG
 24 GluLysGluLysThrProGluProLysGluGluValThrIleLysAlaAsnLeuIleTyrAlaAspGlyLys
 826 ACCCAGACCGCGAGTTCAAGGGCACTTCGAGGAGGCCACCGCGAGGCGCTACCGCTACGCGGACCGCCTGAAG
 49 ThrGlnThrAlaGluPheLysGlyThrPheGluGluAlaThrAlaGluAlaTyrArgTyrAlaAspAlaLeuLys
 901 AAGGACACCGCGAGTACACCGTGGACGTGGCGGACAGGGCTACACCTGACATCAAGTTTCGCGCGGCAAGGAG
 74 LysAspAsnGlyGluTyrThrValAspValAlaAspLysGlyTyrThrLeuAsnIleLysPheAlaGlyLysGlu
 976 AAGACCCCGGAGGACCCAGGAGGAGGTGACCATCAAGGCCAACCTGATCTACGCGGACCGGCAAGACCCAGACC
 99 LysThrProGluGluProLysGluGluValThrIleLysAlaAsnLeuIleTyrAlaAspGlyLysThrGlnThr
 1051 GCCGAGTTCAAGGGCACTTCGAGGAGGCCACCGCGGAGGCGCTACCGCTACGCGGACCGCCTGAAGAGGACAC
 124 AlAGluPheLysGlyThrPheGluGluAlaThrAlaGluAlaTyrArgTyrAlaAspAlaLeuLysLysAspAsn
 1126 GCGAGTACACCGTGGACGTGGCGGACAGGGCTACACCTGAACATCAAGTTTCGCGGCAAGGAGAAGACCCCC
 149 GluGluTyrThrValAspValAlaAspLysGlyTyrThrLeuAsnIleLysPheAlaGlyLysGluLysThrPro
 101 GAGGAGCCCAAGGAGGAGGTGACCATCAAGGCCAACCTGATCTACGCGGACCGGCAAGACCCAGCGAGGATTC
 74 GluGluProLysGluGluValThrIleLysAlaAsnLeuIleTyrAlaAspGlyLysThrGlnThrAlaGluPhe
 176 AAGGGCACTTCGAGGAGGCCACCGGAGGCGCTACCGCTACGCGGACCGCCTGAAGAAGGACAGCGCAGTAC
 199 LysGlyThrPheGluGluAlaThrAlaGluAlaTyrArgTyrAlaAspAlaLeuLysLysAspAsnGlyGluTyr
 1351 ACCGTGGACGTGGCGGACAGGGCTACACCTGAACATCAAGTTTCGCGGCAAGGAGAGACCCCGAGGAGGCC
 224 ThrValAspValAlaAspLysGlyTyrThrLeuAsnIleLysPheAlaGlyLysGluLysThrProGluGluPro
 1426 AAGGAGGAGGTGACCATCAAGGCCAACCTGATCTACGCGGACCGGCAAGACCCAGCGGAGTTCAGGGCAACC
 249 LysGluGluValThrIleLysAlaAsnLeuIleTyrAlaAspGlyLysThrGlnThrAlaGluPheLysGlyThr
 1501 TTCGAGGAGGCCACCGGAGGCGCTACCGCTACGCGGACCGCCTGAAGAAGGACAGCGGAGTACACCGTGGAC
 274 PheGluGluAlaThrAlaGluAlaTyrArgTyrAlaAspAlaLeuLysLysAspAsnGlyGluTyrThrValAsp
 SgrAI NotI
 1576 GTGGCCGACAAAGGCTACACCTGAACATCAAGTTTCGCGGCGCGGCGGACAGAACAAAACTCATCTCAGAGAG
 299 ValAlaAspLysGlyTyrThrLeuAsnIleLysPheAlaGlyAlaAlaAlaGluGlnLysLeuIleSerGluGlu
 Sall HincII AccI
 1651 GATCTGAATGGGCGCGTCGACGGACAAAACGACACCGACCAACCGACGCCCCCTCAGCATCCAGCAACATAAGC
 324 AspLeuAsnGlyAlaValAspGlyGlnAsnAspThrSerGlnThrSerSerProSerAlaSerSerAsnIleSer

Fig. 1 (B)

1726 GGAGGCATTTTCCTTTCTTGGGCCAATGCCATAATCCACCTCTCTCTGCTTTTGTAGGTGACACGCTCTAGA
 349 GlyI yI l ePheLeuPhePheValAlaAsnAlaI l eH i sLeuPheCysPheSer...

1801 GCTATTCTATAGTGTCACTTAATGCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTGTGCCAGCCATCT
 SacI BclI

1876 GTTGTGTTGCCCTCCCCGCTGCTTCTTGACCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCTTTCCTAATAAATGAG
 poly A

1951 GAAATTGCATCGCATTTGTCTGAGTAGGTGTCAATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACGCAAGGGGGAG

2026 GATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGGCGAAAGAACCGTAGGC

2101 GGTAAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGACGAAAGAACATGTGAGCAAAAGCCAGCAAAAGGCCAG
 AflIII
 2176 GAACCGTAAAAAGCCGCGTGTCTGTCGCTTTTTCATAGGCTCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATGAGC

2251 CTCAGCTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTTCCTCTGTGGG

2326 CTCCTCTGTTCGACCCCTGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTTCTCA

2401 TAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGTCTGTTCGCTCCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGGT
 ApaLI

2476 TCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATCTGCTCTGATGCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGGCACT
 Col E1

2551 GGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGTGTGGC
 AlwNI

2626 TAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTGTGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAT

2701 TGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACACCGTGGTAGCGGTGGTTPPTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACCGG

2776 CAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAATCTCAG
 BspHI

2851 TTAAGGGATTTTGTGCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCCACTAGATCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTAA
 Bsu36I AlwNI EcoO109I

2926 ATCAATCTAAAGTATATATGATTAACCTGAGGCTATGGCAGGCGCTGCCGCCCGACGTTGGCTGCGAGCCCTGG
 3001 GCCTTCACCCGAACCTGGGGGTGGGGTGGGGAAGGAAGAACGCGGCGTATTGGCCCCAATGGGGTCTCGG

3076 TGGGGTATCGACAGAGTGCCAGCCCTGGGACCGAACCCCGCGTTTATGAACAACAGCACACACCGTGGCTTTT
 TK poly A

3151 ATTCTGTCTTTTATTGCGCTCATAGCGCGGTTCCTCCGCTATTGTCTCTTCCGTGTTTCAGTTAGCCTCCC

3226 OCTAGGGTGGGCGAAGAACTCCAGCATGAGATCCCCGCGCTGGAGGATCATCCAGCCGCGCTCCCGAAAAAGAT
 AvrII

3301 TCCGAAGCCCAACTTTTCATAGAAGCGCGGTGGAATCGAAATCTCGTGTATGGCAGTTGGGGCTCGCTTTGGTC
 BstBI

3376 GGTCAATTTCGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAATCGTCAAGAAGCGATAGAAGCGCATGCGCTGCGAATCG
 263...PhePheGluAspLeuLeuArgTyrPheAlaI l eArgGlnSerAspP
 SapI

3451 GGAGCGGCGATACCGTAAAGCAGCAGGAAGCGGTGAGCCATTTCGCCGCCAAGCTCTTCAGCAATATACCGGGTA
 246...roAlaAlaI l eGlyTyrLeuValLeuPheArgAspAlaTrrpGluGlyLeuGluGluAlaI l eAspArgThrA
 RsrII

3526 GCCAACGCTATGTCCTGATAGCGGTCCGCCACACCCAGCCGGCCACAGTCGATGAATCCAGAAAGCGCCCATTT
 221...laLeuAlaI l eAspGlnTyrArgAspAlaValGlyLeuArgGlyCysAspI l ePheGlySerPheArgGlyAsnG

Fig. 1 (B) Fortsetzung I

3601 TCCACCATGATATTCCGGAAGCAGGCATCGCCATGGTTCACACGAGATCTCTGCGCTCGGGCATGCTCGCCCTTG
1964 l uVal i Met l l eAsnProLeuCysAlaAspGlyHi sThr Val Val LeuAspGly uGly AspProMet i SerAlaLysL

BclI

3676 AGCCTGGCGAACACCGGCTGGCGCGAGCCCTGATGCTCTTGATCTCTCTGATCGCAAGAACCGGCTTCACATC
1714 euArgAlaPheLeuGlyAlaProAlaLeuGlyyGlnHi sGly uGlnAspAspGlnAspValLeuGlyAlaGly uMetAla
3751 CGAGTACGTGCTCGCTCGATCGCATGTTTTCGCTTGGTGTCTCGAATGGCAGGTAGCCGGATCAACGGTATGTCAGC
1464 r gThrArgAlaArgGly u l l eArgHi sLysAlaGlnHi sAspPheProCysThrAlaProAspLeuThrHi sLeuAla
3826 CGCCGCAATTGCATCAGCATGATGATGATCTTTCTCGGCAGGAGCAAGGTAGATGACAGAGAGATCTCGCCCGGC
1214 r gArgMetAlaAspAlaMet l l eSerValLysGlyAlaAlaProAlaLeuHi sSerSerLeuLeuAspGlnGlyProV

Tth111I PvuIIIFspI

3901 ACTTTCGCCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAGTGACAACGTCGAGCAGCTGGCAAGGAACCGCCGCTC
964 a lGly uGlyLeuLeuLeuTrpAspArgGlyAlaGly uThrValValAspLeuValAlaAlaCysProValGlyThrT

Neo-R.

MscI

3976 GTGGCCAGCCACGATAGCCGCGCTGCCTGCTCTTGCACTTCATTCAGGGCACCGGACAGGTGGTCTTGACAAAA
714 hrAlaLeuTrpSerLeuArgAlaAlaGly uAspGlnLeuGly uAsnLeuAlaGlySerLeuAspThrLysValPheL

NarI

4051 AGAACCGGGCGCCCTTCGCTGACAGCCGAACACGGCGGCATCAGACAGCCGATGTCTGTGTGTCGCCAGTCA
464 euValProArgGlyGlnAlaProSerLeuArgPhePheAlaAlaAspSerCysGly l l eThrGlnGlnAlaAlaTrpAspT

BsaBI

4126 TAGCCGAATAGCTCTCCACCCAGCGCGGAGAACCTGCGTGCAATTCATCTTGTTCATCATCGCAACGAT
214 y rGlyPheLeuArgGly uValTrpAlaAlaProSerGlyAlaHi sLeuGlyAspGlnGly u l l eMet

ClaI AvrII

4271 CCTCATCTCTGCTCTCTTGATCGATCTTTGCAAAAGCCTAGCGCTCCCAAAAAGCCTCCTCACTACTTCTGGAATAG
4276 CTCAGAGCCGAGGAGGCGGCCCTCGCATTAATAAAAAAATAGTCAGCCATGGGCGGAGAATGGGC

SV40 ori & Promotor

4351 GGAACCTGGGCGGAGTTAGGGGGGGGATGGGCGGAGTTAGGGGGCGGACTATGGTGTGCTGACTAATTGAGATGCAT

SexAI

4426 GCTTTGCATACTTCTGCTCTGCTGGGAGCTGGGAGCTTTCCACACCTGGTGTGCTGACTAATTGAGATGCATGCT

PvuII

4501 TTGCATACTTCTGCTGCTGGGAGCTGGGAGCTTTCCACACCTTAAGTGACACACATCCACAGCTGGTCTCTT

Bsu36I

4576 TCCGCTCAGGACTCTTCCCTTTTTCATAAATCAATCTAAAGTATATATAGTAAACTTGGTCTGCAGCTTACCA
2874...Trp

Eam1105I

4551 ATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTCATCCATAGTTGCTGCTACCTCCGCTGCT
4554 Hi sLys l l eLeuSerAlaGly l l eGly uAla l l eGlnArgAsnArgGly uAspMet i ThrAlaGlnSerGlyThrThr
4566 GTAGATACTACGATACGGGAGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCCGAGACCCAGCTCACC
2604 Tyr l l eValVal l l eArgSerProLysGlyAspProGlyLeuAlaAla l l e l l eGlyArgSerGlyArgGly uGly
4801 GGCCTCAGATTATACCAATACAGCCAGCCGCGGAAGGGCGAGCGCAAGTGTGCTGCAACTTTATCCGC
2354AlaGlySerLysAspAla l l ePheTrpGlyAlaProLeuAlaSerArgLeuLeuGly uThrGlyAlaValLysAspAla

FspI Psp1406I

4876 CTCATCCAGTCTATTAATTTGTTCGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGGCCAGCAAGTTGT
2104 Gly uMet i TrpAsp l l eLeuGlnGlnArgSerAlaLeuThrLeuLeuGly uGlyThrLeuLeuLysArgLeuThrThr
4951 TGCCATTGGCCAGGATGTTATCACTATGTTATGCTGCTGCTGTTGTTATGCTTCTTCACTGCTCGGTTCACCAAGATC
1854AlaMetAlaValProMet i ThrThrAspArgGly uAspAsnPro l l eAlaGly uAsnLeuGly uProGly uTrpArgAsp

PvuI

5026 AAGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTAGCTCCTTTCGGTCTCCGATCGTTGTGTCAGAAG
1604LeuArgThrValHi sAspGlyMet iAsnHi sLeuPheAlaThrLeuGly uLysProGlyGly l l eThrThrLeuLeuThr
5101 TGCCATTGGCCAGGATGTTATCACTATGTTATGCGCAGCATGCATAATTTCTTCACTGCTCGGTTCACCAAGATC
1354LeuAsnAlaAlaThrAsnAspSerMet i Thr l l eAlaAlaSerCysLeuGly uArgValThrMetGlyAspThrLeu

bla Scal

5176 ATGCTTTTCTGTGACTGGTGTAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGT
1104Hi sLysGly uThrValProSerTyrGly uValLeuAspAsnGlnSerTyrHi s l l eArgArgGlyLeuGlnGly uGln

Psp1406I

XmnI

5251 CCCGCGCTCAATACGGGATAAATACCGGCCACATAGCAAGCACTTTAAAGTGCTCATCATCTGGAAACAGCTTCTTTC
854GlyAlaAsp l l eArgSerLeuValAlaGly uCysLeuLeuValLysPheThrSerMet iMetProPheArgGly uGly

Fig. 1 (B) Fortsetzung II

5326 GGGGCGAAAACCTCTCAAGGTTTACCGCTGTGTGAGATCCAGTTCGATGTAACTCGTGCACCCAACTGATC
604 Pro Arg Phe Ser Glu Leu Ile Lys Gly Ser Asn Leu Asp Leu Glu Ile Tyr Gl y Val A rg Al a Gl y Leu Gl n Asp
5401 TTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAACAGGAAGGCATAATGCCGCAAAAAGGGAAT
354 Gl u Al a Asp Lys Val Lys Val Leu Thr Gl u Pro Hi s Al a Phe Val P ro Leu Cys Phe Al a Al a Phe Phe P ro Il e
SspI
5476 AAGGCGCACGGAATGTGAATACTCATCTCTCTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTTATCAGGGTTATTG
104 Leu Al a Val A rg Phe Hi s Gl n Il e Ser Met
BspHI
5551 TCTCATGAGCGGATACATATTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCGCGCACATTTCCCGGAAA
Stem loop A
5626 AGTGCCACCTGACGCGCCCTGTAGCGCGCATTAAGCGCGCGGGTGTGTGTTACGCGCAGCGTGACCGCTAC
5701 ACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTCGCTTCTCTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTTCGCGGCTTTTCCCGG
f1 IR Stem loop B
5776 TCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTTGA
Dralll Stem loop C Primer-RNA Start Tran:
51 TTAGGGTGATGGTTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGAGGTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTT VS-Synthese
Nicking site Stem loop D Stem loop E
5926 CTTTAAATAGTGACTCTTGTTCAAACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGTCTATTCTTTTGATTATTAAGG
Apol Apol SspI
6001 GATTTTGCCGATTTTCGGCCTATGTGTTAAAAAATGAGCTGATTTTAAACAAAAATTTAACGCGAAATTTTAAACAAAT
6076 ATTTACGCTTACAAATTAC

Fig. 1 (B) Fortsetzung III

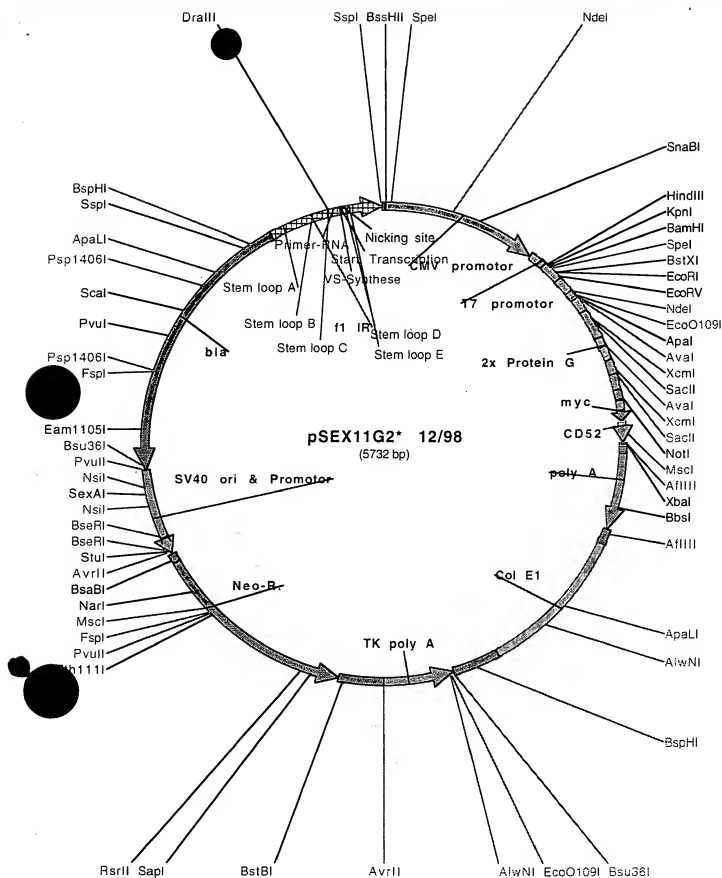


Fig. 2 (A)

BssHII **SpeI**
 1 GCGCGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATA
 76 TGGAGTTCGCGGTTCACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGT
 151 CAATAATGACGTATGTTCCTCATAGTAACGCCAATAGGCACTTTCATTTGACGTCAATGGGTGGACTATTTCAGGT
 226 AAACCTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAAT **CMV**
 301 GGCCCGCCTGGCAATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCA **SnaBI**
 376 TCGCTATTACCATGGTATGCGGTTTITGGCAGTACATCAATGGCGTGGATAGCGGTITGACTCAGCGGGATTTTC
 451 CAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTITTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTGTA
 526 ACAACTCCGCCCATTTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGCTCTATATAAGCAGAGCTCTCTCGC
 601 TAACTAGAGAACCCTGCTTACTGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGAGACCCAAAGCTTGGTACC **T7 promoter** **HindIII/KpnI**
 76 GAGCTCGGATCCACTAGTAACGCCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTGGGGATATCCACCATGGAGACAGACAC
 1 Met Gl u Thr Asp Th
 751 ACTCTGCTACTGGTACTGCTGCTCTGGGTTCGAGGTTCACCTGGTACTATCCATATGATGTTCCAGATTATGC **NdeI**
 5 r LeuLeuLeuTrpVal LeuLeuLeuTrpVal ProGlySer Thr Gl yAsp TyrProTyrAspVal ProAspTyrAl
 826 TGGGGCCCCAAAGCCCGAGGTGATCGATGCCAGCGAGCTGACCCCCGCCGTGACCACTACAAGCTAGTGATCAA **Apal**
 30 aGlyAlaGlnLysProGluVal I I eAspAlaSer GluLeuThr ProAlaVal Thr Thr TyrLysLeuVal I I eAs **Aval**
 901 CGGCAAGACCTGAAGGCGAGACCAACCCGAGGCGTGGACGCCGCCCGGAGAGGTGTTCAAACAATA **XcmI** **SacII**
 55 nGlyLysThr LeuLysGly uThr Thr Thr Gl uAlaValAspAlaAlaThrAlaGluLysVal PheLysGlnTy **Aval**
 96 CGCTAATGACAACCGGGTCGACGGCGAGTGGACTTAACGACGACGCCACCAAGACCTTCCCGTGACCGGAGAGCC **2x Protease G**
 100 rAlaAsnAspAsnGlyValAspGly uThr Thr TyrAspAspAlaThrLysThrPheThrValThrGluLysPr
 151 CGAGGTGATCGATGCCAGCGAGCTGACCCCCCGCGTGACCACTACAAGCTAGTGATCAACGGCAAGACCTGAA
 105 oGluVal I I eAspAlaSer GluLeuThr ProAlaValThrThrLysLeuVal I I eAsnGlyLysThrLeuLy
 1126 GGGCGAGACCAACCGAGGCGGTGGACGCCGCCACCGCGGAGAGGTGTTCAAACAATACGCTAATGACAACGG **XcmI** **SacII**
 130 sGlyGlu uThr Thr Thr GluAlaValAspAlaAlaThrAlaGluLysValPheLysGlnTyrAlaAsnAspAsnGl
 1201 GGTTCGACGGCGAGTGGACTTACGACGACGCCACCAAGACCTTACCGTGACCGAGGCGGCCGAGACCAAACT **NotI**
 155 yValAspGly uThr Thr TyrAspAspAlaThrLysThrPheValThrThrGluAlaAlaGluGlnLysLe
 1276 CATCTCAGAGAGGATCTGAATGGGCGCGTCGACGGACAAAACGACACCAAGCAACAGCAGCCCTCAGCATC **myc**
 180 uLeSer GluGluAspLeuAsnGlyAlaValAspGlyGlnAsnAspThrSerGlnThrSerSerProSerAlaSe
 1351 CAGCAACATAGCGGAGCATTTTCTTTTCTTCGTGGCCAAATGCCATAATCCACCTCTTCTGCTTCAGTTGAGG **CD52** **MscI**
 205 rSerAsnIleSerGlyGlyIlePheLeuPhePheValAlaAsnAlaIleIleHisLeuPheCysPheSer...

Fig. 2 (B)

AflIII/XbaI
 1426 TGACACGCTCTAGACCTATTCTCTATAGTGTACCTAAATGCTAGAGCTCTCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAG
 1501 TTGCCAGCCATCTGTGTGTTGCCCTCCCCCGTCCCTTCCTTGACCTTGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTCTTC
 1576 CTAATAAAATGAGGAAATTCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCTTCTATCTTCTGCGGGGTGGGTGGGGCAGGA
 1651 CAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGTCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGCGGA
 1726 AAGAACCAGTGGCGGTAAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCC
 1801 AGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTGTCTGGCGTTTTCCTAGGCTCCGCCCTCTAGCAGCATC
 1876 ACAAATTCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCGACAGACTATAAAGATACCAAGCGTTTCTCCCTTGGAA
 1951 GCTCCCTCGTGGCGCTCTCTCTGTTCGACCTTCGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGGG
 2026 TGGCGCTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCTGTCTGCCAAGCTGGCGTGTGTGC
 2101 ACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACTATCTGCTTCTGAGTCCAACCGGTAAAGACAG
 2176 ACTTATCGCCACTGGCAGCGCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGCGGTCTCTACAGAGTTCT
 2251 TGAAGTGGTGGCCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTAAT
 2326 TCGGAAAAGAGTTGGTAGCTCTGTATCCGCAACAAACCAACCGCTCTGTAGCGGTGTTTCTTTTGTGTTTCAAGC
 2401 AGCAGATTACCGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCTTGTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAA
 2476 ACGAAAACCTACGTTAAGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACTAGATCTTTTAAATTAA
 2551 AATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATAGTAACTGAGGCTATGGCAGGCGCTCGCCCGCCGACGTGG
 2576 CTGCGAGCCCTGGGCTTCAACCGAACTTTGGGGGTGGGGTGGGAAAAGGAAGAACGCGGGCTATTGGCCCG
 2701 AATGGGTCTCGGTGGGGTATCGACAGAGTGCACCGCTGGGACCGAACCCCGGTATTGAAACAAACGACCCAA
 2776 CACCGTGCCTTTTATCTGTCTTTTATTGCGCTCATAGCGCGGTCTCTCCGTTATGTCTCTCTCCGCTGTTT
 2851 CAGTTAGCTCTCCCCTAGGGTGGGCGAAGAACTCCAGCATGAGATCCCGCGCTGGAGGATCATCCAGCGCGCT
 2926 CCGCGAAAACGATTCCGAAGCCCAACCTTTCTATAGAAGCGCGCGTGGAAATCGAAATCTGTGATGGCAGGTGG
 3001 GCGTCGCTTGGTGGCTATTTCGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGCGGATAGAAGCGAT
 3076 GCGCTCGAATCGGAGCGCGCATACCGTAAAGCAGCAGGAAAGCGGTGAGCCATTCGCGCGCAAGCTCTTCAGC
 3151 AATATACCGGTAGCAACGCTATGTCTGATAGCGGTCCGCCACACCGCGGCCACAGTCGATGAATCCAGA
 3226 ATAGCGGCATTTTCACCATGATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTCAACGAGATCTCCGCGCTCGG
 3301 GCGTCGCTTGGTGGCTATTTCGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGCGGATAGAAGCGAT
 3376 GCGCTCGAATCGGAGCGCGCATACCGTAAAGCAGCAGGAAAGCGGTGAGCCATTCGCGCGCAAGCTCTTCAGC
 3451 AATATACCGGTAGCAACGCTATGTCTGATAGCGGTCCGCCACACCGCGGCCACAGTCGATGAATCCAGA
 3526 ATAGCGGCATTTTCACCATGATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTCAACGAGATCTCCGCGCTCGG
 3601 GCGTCGCTTGGTGGCTATTTCGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGCGGATAGAAGCGAT
 3676 GCGCTCGAATCGGAGCGCGCATACCGTAAAGCAGCAGGAAAGCGGTGAGCCATTCGCGCGCAAGCTCTTCAGC
 3751 AATATACCGGTAGCAACGCTATGTCTGATAGCGGTCCGCCACACCGCGGCCACAGTCGATGAATCCAGA
 3826 ATAGCGGCATTTTCACCATGATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTCAACGAGATCTCCGCGCTCGG
 3901 GCGTCGCTTGGTGGCTATTTCGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGCGGATAGAAGCGAT
 3976 GCGCTCGAATCGGAGCGCGCATACCGTAAAGCAGCAGGAAAGCGGTGAGCCATTCGCGCGCAAGCTCTTCAGC
 4051 AATATACCGGTAGCAACGCTATGTCTGATAGCGGTCCGCCACACCGCGGCCACAGTCGATGAATCCAGA
 4126 ATAGCGGCATTTTCACCATGATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTCAACGAGATCTCCGCGCTCGG
 4201 GCGTCGCTTGGTGGCTATTTCGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGCGGATAGAAGCGAT

BbsI
 1651 CAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGTCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGCGGA

AflIII
 1726 AAGAACCAGTGGCGGTAAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCC
 1801 AGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTGTCTGGCGTTTTCCTAGGCTCCGCCCTCTAGCAGCATC
 1876 ACAAATTCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCGACAGACTATAAAGATACCAAGCGTTTCTCCCTTGGAA
 1951 GCTCCCTCGTGGCGCTCTCTCTGTTCGACCTTCGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGGG

ApaLI
 2026 TGGCGCTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCTGTCTGCCAAGCTGGCGTGTGTGC

Col E1
 2101 ACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACTATCTGCTTCTGAGTCCAACCGGTAAAGACAG

AlwNI
 2176 ACTTATCGCCACTGGCAGCGCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGCGGTCTCTACAGAGTTCT
 2251 TGAAGTGGTGGCCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTAAT
 2326 TCGGAAAAGAGTTGGTAGCTCTGTATCCGCAACAAACCAACCGCTCTGTAGCGGTGTTTCTTTTGTGTTTCAAGC
 2401 AGCAGATTACCGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCTTGTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAA

BspHI
 2476 ACGAAAACCTACGTTAAGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACTAGATCTTTTAAATTAA

EcoO109I
 2551 AATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATAGTAACTGAGGCTATGGCAGGCGCTCGCCCGCCGACGTGG
 2576 CTGCGAGCCCTGGGCTTCAACCGAACTTTGGGGGTGGGGTGGGAAAAGGAAGAACGCGGGCTATTGGCCCG

Bsu36I
 2576 CTGCGAGCCCTGGGCTTCAACCGAACTTTGGGGGTGGGGTGGGAAAAGGAAGAACGCGGGCTATTGGCCCG

AlwNI
 2576 CTGCGAGCCCTGGGCTTCAACCGAACTTTGGGGGTGGGGTGGGAAAAGGAAGAACGCGGGCTATTGGCCCG

TK poly A
 2701 AATGGGTCTCGGTGGGGTATCGACAGAGTGCACCGCTGGGACCGAACCCCGGTATTGAAACAAACGACCCAA
 2776 CACCGTGCCTTTTATCTGTCTTTTATTGCGCTCATAGCGCGGTCTCTCCGTTATGTCTCTCTCCGCTGTTT

AvrII
 2851 CAGTTAGCTCTCCCCTAGGGTGGGCGAAGAACTCCAGCATGAGATCCCGCGCTGGAGGATCATCCAGCGCGCT
 2926 CCGCGAAAACGATTCCGAAGCCCAACCTTTCTATAGAAGCGCGCGTGGAAATCGAAATCTGTGATGGCAGGTGG
 3001 GCGTCGCTTGGTGGCTATTTCGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGCGGATAGAAGCGAT
 3076 GCGCTCGAATCGGAGCGCGCATACCGTAAAGCAGCAGGAAAGCGGTGAGCCATTCGCGCGCAAGCTCTTCAGC
 3151 AATATACCGGTAGCAACGCTATGTCTGATAGCGGTCCGCCACACCGCGGCCACAGTCGATGAATCCAGA
 3226 ATAGCGGCATTTTCACCATGATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTCAACGAGATCTCCGCGCTCGG
 3301 GCGTCGCTTGGTGGCTATTTCGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGCGGATAGAAGCGAT
 3376 GCGCTCGAATCGGAGCGCGCATACCGTAAAGCAGCAGGAAAGCGGTGAGCCATTCGCGCGCAAGCTCTTCAGC
 3451 AATATACCGGTAGCAACGCTATGTCTGATAGCGGTCCGCCACACCGCGGCCACAGTCGATGAATCCAGA
 3526 ATAGCGGCATTTTCACCATGATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTCAACGAGATCTCCGCGCTCGG
 3601 GCGTCGCTTGGTGGCTATTTCGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGCGGATAGAAGCGAT
 3676 GCGCTCGAATCGGAGCGCGCATACCGTAAAGCAGCAGGAAAGCGGTGAGCCATTCGCGCGCAAGCTCTTCAGC
 3751 AATATACCGGTAGCAACGCTATGTCTGATAGCGGTCCGCCACACCGCGGCCACAGTCGATGAATCCAGA
 3826 ATAGCGGCATTTTCACCATGATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTCAACGAGATCTCCGCGCTCGG
 3901 GCGTCGCTTGGTGGCTATTTCGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGCGGATAGAAGCGAT
 3976 GCGCTCGAATCGGAGCGCGCATACCGTAAAGCAGCAGGAAAGCGGTGAGCCATTCGCGCGCAAGCTCTTCAGC
 4051 AATATACCGGTAGCAACGCTATGTCTGATAGCGGTCCGCCACACCGCGGCCACAGTCGATGAATCCAGA
 4126 ATAGCGGCATTTTCACCATGATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTCAACGAGATCTCCGCGCTCGG
 4201 GCGTCGCTTGGTGGCTATTTCGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGCGGATAGAAGCGAT

BstBI
 3001 GCGTCGCTTGGTGGCTATTTCGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGCGGATAGAAGCGAT

SapI
 3076 GCGCTCGAATCGGAGCGCGCATACCGTAAAGCAGCAGGAAAGCGGTGAGCCATTCGCGCGCAAGCTCTTCAGC
 3151 AATATACCGGTAGCAACGCTATGTCTGATAGCGGTCCGCCACACCGCGGCCACAGTCGATGAATCCAGA
 3226 ATAGCGGCATTTTCACCATGATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTCAACGAGATCTCCGCGCTCGG
 3301 GCGTCGCTTGGTGGCTATTTCGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGCGGATAGAAGCGAT
 3376 GCGCTCGAATCGGAGCGCGCATACCGTAAAGCAGCAGGAAAGCGGTGAGCCATTCGCGCGCAAGCTCTTCAGC
 3451 AATATACCGGTAGCAACGCTATGTCTGATAGCGGTCCGCCACACCGCGGCCACAGTCGATGAATCCAGA
 3526 ATAGCGGCATTTTCACCATGATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTCAACGAGATCTCCGCGCTCGG
 3601 GCGTCGCTTGGTGGCTATTTCGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGCGGATAGAAGCGAT
 3676 GCGCTCGAATCGGAGCGCGCATACCGTAAAGCAGCAGGAAAGCGGTGAGCCATTCGCGCGCAAGCTCTTCAGC
 3751 AATATACCGGTAGCAACGCTATGTCTGATAGCGGTCCGCCACACCGCGGCCACAGTCGATGAATCCAGA
 3826 ATAGCGGCATTTTCACCATGATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTCAACGAGATCTCCGCGCTCGG
 3901 GCGTCGCTTGGTGGCTATTTCGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGCGGATAGAAGCGAT
 3976 GCGCTCGAATCGGAGCGCGCATACCGTAAAGCAGCAGGAAAGCGGTGAGCCATTCGCGCGCAAGCTCTTCAGC
 4051 AATATACCGGTAGCAACGCTATGTCTGATAGCGGTCCGCCACACCGCGGCCACAGTCGATGAATCCAGA
 4126 ATAGCGGCATTTTCACCATGATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTCAACGAGATCTCCGCGCTCGG
 4201 GCGTCGCTTGGTGGCTATTTCGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGCGGATAGAAGCGAT

RsrII
 3151 AATATACCGGTAGCAACGCTATGTCTGATAGCGGTCCGCCACACCGCGGCCACAGTCGATGAATCCAGA
 3226 ATAGCGGCATTTTCACCATGATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTCAACGAGATCTCCGCGCTCGG
 3301 GCGTCGCTTGGTGGCTATTTCGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGCGGATAGAAGCGAT
 3376 GCGCTCGAATCGGAGCGCGCATACCGTAAAGCAGCAGGAAAGCGGTGAGCCATTCGCGCGCAAGCTCTTCAGC
 3451 AATATACCGGTAGCAACGCTATGTCTGATAGCGGTCCGCCACACCGCGGCCACAGTCGATGAATCCAGA
 3526 ATAGCGGCATTTTCACCATGATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTCAACGAGATCTCCGCGCTCGG
 3601 GCGTCGCTTGGTGGCTATTTCGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGCGGATAGAAGCGAT
 3676 GCGCTCGAATCGGAGCGCGCATACCGTAAAGCAGCAGGAAAGCGGTGAGCCATTCGCGCGCAAGCTCTTCAGC
 3751 AATATACCGGTAGCAACGCTATGTCTGATAGCGGTCCGCCACACCGCGGCCACAGTCGATGAATCCAGA
 3826 ATAGCGGCATTTTCACCATGATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTCAACGAGATCTCCGCGCTCGG
 3901 GCGTCGCTTGGTGGCTATTTCGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGCGGATAGAAGCGAT
 3976 GCGCTCGAATCGGAGCGCGCATACCGTAAAGCAGCAGGAAAGCGGTGAGCCATTCGCGCGCAAGCTCTTCAGC
 4051 AATATACCGGTAGCAACGCTATGTCTGATAGCGGTCCGCCACACCGCGGCCACAGTCGATGAATCCAGA
 4126 ATAGCGGCATTTTCACCATGATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTCAACGAGATCTCCGCGCTCGG
 4201 GCGTCGCTTGGTGGCTATTTCGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGCGGATAGAAGCGAT

263 PhePheGlu uAspLeuLeuArgTyrPheAlaIle
 251 ArgGlnSerAspProAlaAlaIleGlyTyrLeuValLeuPheArgAspAlaTrpGluGlyLeuGluGlyAlaIle

3301 CATGCTCGCTTGAGCCTCTACAGTTGGCTGGCGAGCCCTGATGCTGATCATCTGTATGACACAAG
176 Met Ser Al aLysLeuArgAl aLeuGl uAl aProAl aLeuGl yGl nHi sG nAspAspGl nAspVal lLeu
3376 ACCGGCTTCCATCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTCGCTTGGTGGTCAATGGCAGGTAGCCGAGT
151 Gl yAl aGl uMeTArGhrThrArgAl aArgGl u l l eArgHi sLysAl aGl nHi sAspPheProCysThrAl aProAsp
3451 AAGCGTATGACGCCGCCGATTCATCAGCCATGATGATACCTTCTCGGCAGGACCAAGTGGATGATGACAGGAG
126 LeuThrHi sLeuArgArgMeTAl aAspAl aMeT l l eSerValLysGl uAl aProAl aLeuHi sSerSerLeuLeu

FspI

Tth1111 PvuII

3526 ATCCCTGCCCCGCACTTGCCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAGTGACAACGTCGAGCAGCAGCTGCGCA
101 AspGl nGl yProVal lGl uGl yLeuLeuLeuTrpAspArgGl yAl aGl uThrValValAspLeuValAl aAl aCys

NcoI

MscI

3601 AGGAACGCCCGCTGCTGGCCAGCCACGATAGCCGCCGCTGCTCGCTTCGAGTTTCATTACGGGACCCGGACAGGTC
76 ProVal lGl yThrThrAl aLeuTrpSerLeuArgAl aAl aGl uAspGl nLeuGl uAsnLeuAl aGl ySerLeuAsp

NarI

3676 GGTCTTGACAAAAGAACCGGGCGCCCTCGCTGACAGCCGGAACCGGGCGCATCAGAGCAGCCGATTTGTCTG
51 ThrLysVal lPheLeuVal lProArgGl yGl nAl aSerLeuArgPheValAl aAl aAspSerCysGl y l l eThrGl n
3751 TTGTGCCCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCCACCCACGGCGGAGAACCTCGTGAATCCTCATCTTGTTCAT
26 Gl nAl aTrpAspTyrGl yPheLeuArgGl uVal lTrpAl aAl aProSerGl yAl aHi sLeuGl yAspGl nGl u l l e

StuI

BsaBI AvrII BseRI

3826 CATGCGAAACGATCTCATCTCTGTCTTTGATCGATCTTTTGCAAAAGCTAGGCCCTCAAAAAGCCTCTCTCACT
1 Met

BseRI

3901 ACTTCTGGAATAGCTCAGAGGCCGAGGAGGCCGCTCGGCCCTTGCAATAAATAAAAAATTTAGTCAGCCATGGG

SV40 ori & Promotor

3976 GCGGAGAATGGGCGAACTGGGCGGAGTTAGGGCGGGATGGGCGGAGTTAGGGCGGGACTATGGTGTCTGACT

NsiI SexAI

4051 AATTGAGATGCATGCTTTGCATACTTCTGCTGCTGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCTGTTGTCTGACTAAT

NsiI

4126 TGAGATGCATGCTTTGCATACTTCTGCTGCTGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCCCTAATGACACACATTCC

PvuII Bsu36I

4201 ACAGCTGGTTCTTTCCGCCCTCAGGACTCTTCCTTTTTCATAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGT
4276 CTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTTCATCCATAGTTGCGCT
287 Met TrpHi sLys l l eLeuSerAl aGl y l l eGl uAl a l l eGl nArgAsnArgGl uAspMet lThrAl aGl

Eam1105I

4301 GACTCCCCGCTGCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAG
44 NserGl yThrThrTyr l l eValVal l l eArgSerProLysGl yAspProGl yLeuAl aAl a l l e l l eGl yArgSe
4426 ACCCAAGCTCAACGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGAGAGTGGTCTCTG
239 Gl yArgGl yAl aGl ySerLysAspAl a l l ePheTrpGl yAl aProLeuAl aSerArgLeuLeuProGl yAl
4501 CAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTTAATTTGTTGGCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTTCCCGAGTTAATAGTT
214 ValLysAspAl aGl uMeT lTrpAsp l l eLeuGl nGl nArgSerAl aLeuThrLeuLeuGl uGl yThrLeuLeuLy

FspI Psp1406I

4576 TGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGCTGTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCG
189 sArgLeuThrThrAl aMeTAl aValProMeTThrThrAspArgGl uAspAsnPro l l eAl aGl uAsnLeuAl aPr

PvuI

4651 GTTCCCAACGATCAAGCGAGTTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCTCTCGGTCCTCCGA
164 oGl uTrpArgAspLeuArgThrValHi sAspGl yMeTAsnHi sLeuPheAl aThrLeuGl uLysProGl yGl y l l
4726 TCGTTGTGAGAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTTCTTACTGTCA
139 eThrThrLeuLeuLeuAl aAl aThrAsnAspSerMeTThr l l eAl aAl aSerCysLeuGl uArgVal lThrMe

bla Scal

4801 TGCCATCCGTAAGATGCTTTCTGTGACTGGTGACTCAACAAGTCACTTCTGAGAATAGTGATGCGCGAC
114 Gl yAspThrLeuHi sLysGl uThrValProSerTyrGl uValLeuAspAsnGl nSerTyrHi s l l eArgArgGl
4876 CGAGTTGCTCTTGGCCCGCTCAATACGGGATAATACCGCCACATCAGCAACTTTAAAGTGCTCATCATG
89 yLeuGl nGl uGl nGl yAl aAsp l l eArgSerLeuValAl aAl aGl yCysLeuLeuVal lLysPheThrSerMeTMeTPr

Psp1406I

ApaLI

4951 GAAACGTTCTTCGGGGCGAAATCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCGATGTAACCACTCGTG
64 oPheArgGl uGl uProArgPheSerGl uLeu l l eLysGl ySerAsnLeuAspLeuGl u l l eTyrGl yValArgAl

Fig. 2 (B) Fortsetzung II

5026 CACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCGG
 394 aGlyLeuGlnAspGluAlaAspLysValLysValLeuThrGluProHisAlaPheValProLeuCysPheAlaAla
 SspI

5101 CAAAAAGGGAATAGGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTCTTTTCAATATTATGAAGCATTT
 144 aPhePheProIleLeuAlaValArgPheHisGlnIleSerMet
 BspHI

5176 ATCAGGGTTATTGTCTCATGACGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCGCGCA
 5251 CATTTCCCGAAAAAGTGCCACCTGACGCGCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTTACGCGCA

Stem loop A

5326 GCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTCGCTTTCCTTCCTTTCCTTCGCCACGTTG

f1 IR Stem loop B

5401 CCGGCTTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGGGGTCCCTTTAGGGTTCGATTTAGTGCTTTACGGCACTCGACC

DraIII Stem loop C Primer-RNA

5476 CCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGCGGTTTTTCGCCCTTTACGT

Start Transcription
 VS-Synthese Nicking site Stem loop D Stem loop E

551 TGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTGTTCAAAAGTGAACAACACTCAACCCATCTCGGTCTATTCTT

5626 TTGATTTATAAGGGATTTTCCCGATTTCCGCCATTGGTTAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGA

SspI

5701 ATTTTACAAAAATATTACGCTTACAAATTAC

Fig. 2 (B) Fortsetzung III

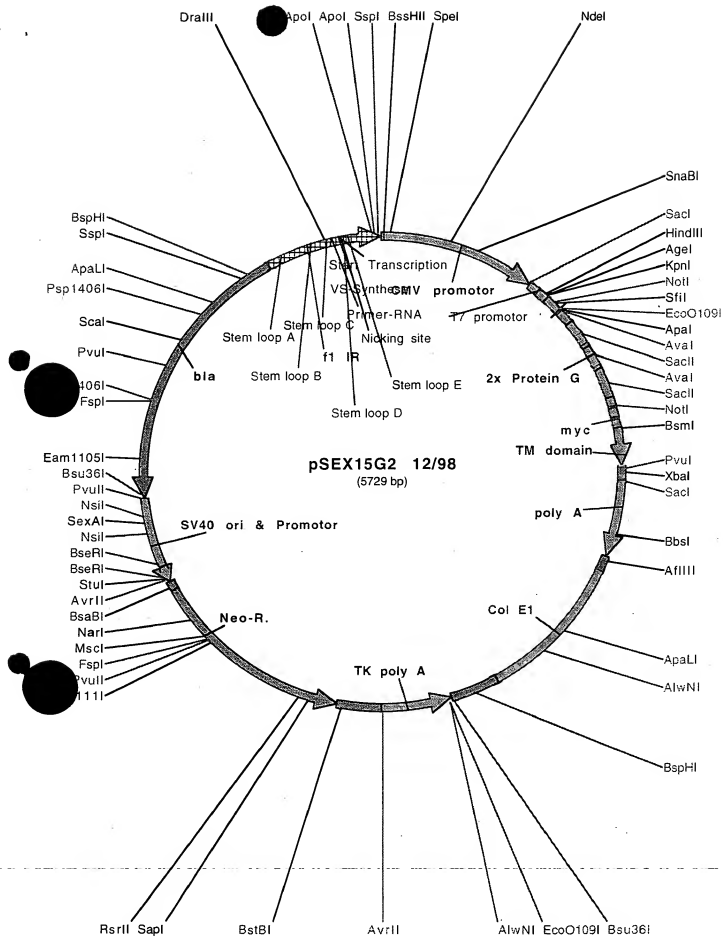


Fig. 3 (A)

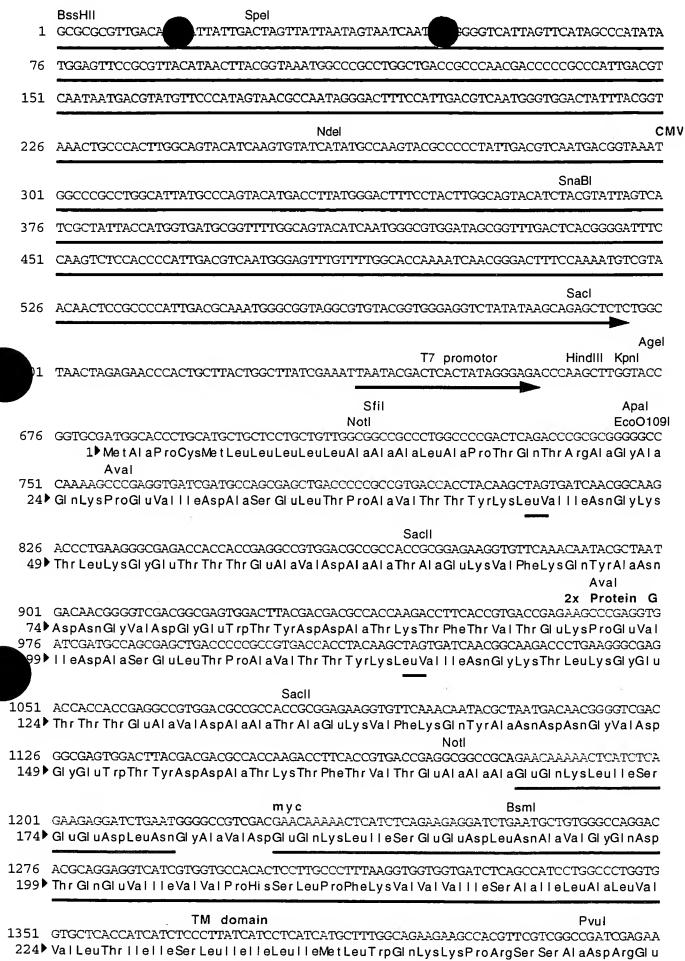


Fig. 3 (B)

XbaI
 1426 TC CATCTAGAGCTATTCTA...GTGCACCTAAATGCTAGAGCTCGCTGATCA...TCGACTGTGCCTTC TAGTTG
 249 Ser Ile... ←

SacI
 1501 CCAGCCATCTGTGTGTGTGCCCTCCCCGTGCCTTCCTTGACCCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTCTCCTA
 poly A
 1576 ATAAATAGGAAATTCATCGCATGTGCTGAGTAGGTGTCATCTTATCTTGGGGGTGGGTGGGGCAGGACAG

BbsI
 1651 CAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGTGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAG

AflIII
 1726 AACCAGTGGCGGTAATACGGTTATTCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGC
 1801 AAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCGCGTTGCTGCGCTTTTTCATAGGCTCCGCCCTTACGAGCATCA
 1876 AAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAGATACAGGCGCTTCCCTCTGAAAGCT
 1951 CCGTCGTGCGCTCTCTCTGTTCCGACCTGCGGCTTACCGGATACCTTCCGCCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGG

ApaLI
 2026 CGCTTTCTCATAGCTCAAGCTGTAGTATCTCACTCGGTGTAAGTCTGCTCGCTCCAAAGCTGCGTGTGTCAGC

Col E1
 2101 AACCCCGGTTACGCCCGACCGCTGCCCTTATCCGGTAACTATGCTCTTGAAGTCCAAACCGTAAAGACAGACT

AlwNI
 2176 TATCGCCACTGGCAGCAGCCTAGTAAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGA
 2251 AGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGCACAGTATTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCG
 2326 GAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAACCCCGCTGGTAGCGGTGGTTTGTGTTTGAAGCAGC
 2401 AGATTACGCGCAGAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAAG

BspHI
 2476 AAAACTCAGCTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACTAGATCCTTTTAAATTAATAAT

Bsu36I
 2551 GAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATAGTAACTGAGGCTATGGCAGGCGCTGCCCGCCGAGCTTGGCTG
 26 CGAGCCCTGGGCGCTTCAACCGAAGCTTGGGGGTGGGTGGGGGAAAGGAAGAAACGCGCGCTATTGGCCCAAT

EcoO109I
 2701 GGGGTCTCGTGGGGTATCGACAGAGTGCAGCCCTGGGACCGAACCCCGCTTTATGAACAACAGCACCACAC
 TK poly A
 2776 CGTGGCTTTTATCTGCTCTTTTATGCGCTCATAGCGCGGGTTCCTTCGGGTATGTCTCTCTCCGCTTTTCAG

AvrII
 2851 TTAGCTCCCTTAGGGTGGGCGAAGAACTCCAGCATGAGATCCCGCGCTGGAGGATCATCAGCCGCGTCCC
 2926 GGAAAAAGATTCCGAAGCCCAACCTTTTATAGAAGCGCGCGGTGAATCGAAATCTCGTATGGCAGGTGGGGC
 BstBI
 3001 TCGCTGTGTCGGTCAATTTCGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGCGGATAGAAGCGATGCG
 263 PhePheGluAspLeuLeuArgTyrPheAlaIleArg
 SapI
 3076 CTGCGAATCGGGAGCGCGATACCGTAAAGCAGGAGGAGCGGTACGCCCATTCGCCGCAAGCTCTTCAGCAAT
 2501 GluSerAspProAlaAlaIleGluTyrLeuValLeuPheArgAspAlaTrpGluGluGluGluAlaIle
 RsrII
 3151 ATCAGCGGTAGCCAACGCTATGTCTGATAGCGGTCCGCCACACCGCGGCCACAGTCGATGAATCCAGAAAA
 225 AspArgThrAlaLeuAlaIleAspGlnTyrArgAspAlaValGluLeuArgGluCysAspIlePheGluSerPhe
 3226 CGGGCCATTTTCCACCATGATATTCGCAAGCAGGATCGCCATGGGTACAGCAGAGATCTCGCGCTCGGGCAT
 200 ArgGluAsnGluValMetIleAsnProLeuCysAlaAspGluYHisThrValValLeuAspGluGluYaspProMet

Fig. 3 (B) Fortsetzung I

3301 GCTCGCCTTGAGCGCTGGCGAACAGTTTCGGCTGGCGGAGCCCTGATGCTCTTGATCATCTTGATCGACAAGACC
 175 Ser Ala Lys Leu Arg Ala Phe Leu Gl uAl a Pro Ala Leu Gl y Gl n Hi a Gl u Gl n Asp Asp Gl n Asp Val Leu Gl y
 3376 GGCTTCCATCCGCTGCTGCTCGCTCGATGCGATGTTTCGCTTCGCGAATGGGCGCATGCGCGGATCAAG
 150 Al a Gl u Me t Arg Thr Arg Ala a Arg Gl u l l e Arg Hi s Lys Ala a Gl n Hi s Asp Phe Pro Cys Thr Ala a Pro Asp Leu
 3451 CGTATCGACGCCCGCATTCGATCGACCATGATGATCTTTCTCGGCAGGACGAAGGTGAGATGACAGGAGATC
 125 Thr Hi s Leu Arg Arg Me t Ala a Asp Ala a Me t l l l e Ser Val Lys Gl uAl a Pro Ala Leu Hi s Ser Ser Leu Leu Asp
 Tth1111 PvuII FspI
 3526 CTGCCCCGGCACCTTCGCCCAATAGCAGCCAGTCCTTCCCGCTTCAGTGACACGTCGAGCAGCTGCGCAAGG
 100 Gl n Gl y Pro Val Gl u Gl y Leu Leu Leu Trp Asp Arg Gl yAl a Gl u Thr Val Val Asp Leu Val Al aAl a Cys Pro
Neo-R.
 MscI
 3601 AACGCCCTGCTGGCCAGCCAGCATAGCCGCGCTGCCTCGCTTCGAGTTTCATTAGGGACCGGACAGGTCGGT
 75 Val Gl y Thr Thr Ala Leu Trp Ser Leu Arg Ala aAl a Gl u Asp Gl n Leu Gl u Asn Leu Al a Gl y Ser Leu Asp Thr
 NarI
 3676 CTTGACAAAAAGAACCGGCCCTGCGCTGACAGCCGGAACACGGCGGCATCAGACGAGCCGATTTGTCTGTGTTG
 50 Lys Val Phe Leu Val Pro Arg Gl y Gl nAl a Ser Leu Arg Phe Val Al aAl a Asp Ser Cys Gl y l l e Thr Gl n Gl n
 3751 TGCCCAAGTCATAGCCGAATAGCTCTCCACCCAGCGCGGAGAACCTGCGTCAATCCATCTGTGTTCAATCATC
 25 Al a Trp Asp Tyr Gl y Phe Leu Arg Gl u Val Trp Ala aAl a Pro Ser Gl yAl a Hi s Leu Gl y Asp Gl n Gl u l l e Me t
 StuI
 3826 GCGAAACGATCCTCATCTGCTCTCTTGATCGATCTTTTGCAAAAGCCTAGGCCCTCCAAAAAGCCTCCTCACTACT
 BsaBI AvrII BseRI
 3971 TCTGGAATAGCTCAGAGCCGAGGAGCGGCTCGGCCCTTCGATATAAATAAAAAATTTAGTCAGCCATGGGGCG
SV40 ori & Promoter
 3976 GAGAATGGGCGGAACCTGGGCGGAGTTAGGGCGGGATGGCGGAGCTTAGGGCGGGACTATGGTTGCTGACTAAT
 NsiI SexAI
 4051 TGAGATGATGCTGTTTGATCTACTTCTGCTGCTGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCTGCTGGTGTGCTACTAATTGA
 NsiI PvuII
 4126 GATGCATGCTTTTGATCTACTTCTGCTGCTGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCTTAACGACACACATTCACAC
 Bsu36I
 4201 GCTGGTTCTTTCCGCTCAGGACTCTTCCTTTTTCAATAAATCAATCTAAAGTATATATAGTAAACTTGGTCTG
 Eam11I
 4276 ACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGACTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCTGAC
 287 4 T r p Hi s Lys l l e Leu Ser Al a Gl y l l e Gl u Al a l l e Gl n Arg Asn Arg Gl u Asp Me t Thr Al a Gl n Se
 4351 TCCCGCTGCTGATAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCGACTGCTGCAATGATACCCGAGAGCC
 53 4 r Gl y Thr Thr Tyr l l e Val Val l l e Arg Ser Pro Lys Gl y Asp Pro Gl y Leu Al aAl a l l e l l e Gl y Arg Ser Gl
 436 CAGCTCACCGGCTCCGATTATTCAGCAATAAACAGCCAGCCGCGGAGGGCCGAGCGAGCAAGTGGTCTCTGCAA
 58 4 y A r g Gl u Gl yAl a Gl y Ser Lys Asp Al a l l e Phe Trp Gl yAl a Pro Leu Al a Ser Arg Leu Leu Pro Gl yAl a Va
 FspI
 4501 CTMTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCGCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTGCCAGTTAATAGTTTGC
 213 l Lys Asp Al a Gl u Me t Trp Asp Al a Leu Gl n Arg Ser Al a Leu Thr Leu Gl u Gl y Thr Leu Lys As r
 Psp1406I
 4576 GCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTGGTTGGTATGGCTTACCTCAGCTCCGGTT
 188 4 g Leu Thr Thr Al a Me t Al a Val Pro Me t Thr Thr Asp Arg Gl u Asp Asn Pro l l e Al a Gl u Asn Leu Gl u Pro Gl
 PvuI
 4651 CCCAAGCATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCG
 163 4 u Trp Arg Asp Leu Arg Thr Val Hi s Asp Gl y Me t Asn Hi s Leu Phe Al a Thr Leu Gl u Lys Pro Gl y Gl y l l e Thr
 4726 TTGTCAGAACTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCAATGGTTATGGCAGACATGCAATATCTCTTACTGTCATCG
 138 4 r Thr Leu Leu Leu Asn Al aAl a Thr Asn Asp Ser Me t Thr l l e Al aAl a Ser Cys Leu Gl u Arg Val Thr Me t Gl
 bla Scal
 4801 CATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATCTCAGAAATAGTGTATGCGGCGACCGA
 113 y Asp Thr Leu Hi s Lys Gl y Thr Val Pro Ser Tyr Gl u Val Leu Asp Asn Gl n Ser Tyr Hi s l l e Arg Arg Gl y Le
 4876 GTTGCTCTTCCCGCGCTCAATACGGGATAATACCGGCCACATAGCAAGCTTTAAAGATGCTCATCATTTGGA
 88 4 u Gl n Gl u Gl n Gl yAl a Asp l l e Arg Ser Leu Val Al a Gl y Cys Leu Leu Val Lys Phe Thr Ser Me t Me t Pro Ph
 Psp1406I ApaLI
 4951 AACGTTCTTCGGGCGCAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCCGATGTAACCACTCTGTCGAC
 63 4 e Arg Gl u Gl u Pro Arg Phe Ser Gl u Leu l l e Lys Gl y Ser Asn Leu Asp Leu Gl u l l e Tyr Gl y Val A r g Al a Gl

Fig. 3 (B) Fortsetzung II

5026 CCAACTGATCTTCAGCATCTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAATAGGAAGGCCAAAATGCCGCAA
 384 yLeuGlnAspGluAlaAspGlyValLysValLeuThrGluProHisAlaPheProLeuCysPheAlaAlaPhe
 SspI
 5101 AAAAGGGAATAAGGGCGACGGAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATC
 134 ePheProIleLeuAlaValAlaArgPheHisGlnIleSerMet
 BspHI
 5176 AGGGTTATTTGTTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACAT
 5251 TTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGGCGCCGTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGGGGTGTGGTGGTTACGGCGCAGCG

Stem loop A
 5326 TGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTTCGCCACGTTTCGCCG

f1 IR Stem loop B
 5401 GCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTTCGATTTAGTGCTTACGGCACCTGCACCCCA

Drall Stem loop C Primer-RNA
 5476 AAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTCATAGACGGTTTTCGCCCTTTGACGTTGG

Start Transcription
 VS-Synthase Nicking site Stem loop D Stem loop E
 5551 AGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCCATCTCGGTCTATTCTTTTGG

Apol Apol
 5626 ATTATTAAGGGATTTTGGCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGGGAATT

SspI
 5701 TTAACAAAAATTAAACGCTTACAATTTAC

Fig. 3 (B) Fortsetzung III

THIS PAGE BLANK (USPTO)